柑橘珠心胚之試管培養及網室栽培[1)]

Nucellar Embryogenesis of Citrus In Vitro and Extended Growth in Screen House

黃麗春[2)] 葉節耀[3)] 林瓊玖[4)]

Huang Li-chun, Yeh Light Chie-yauw, Lin Chiung-chiuo

摘 要：單胚及多胚柑橘皆可由試管內珠心組織的培養，誘導珠心胚的分化、珠心胚可進而分化植株，試驗之單胚柑橘爲麻豆白柚及麻豆文旦、多胚柑橘爲粗皮檸檬、黎檬、酸橙、酸橘、美女橘、枳殼、椪柑及柳橙。珠心胚之分化因樹種不同，須要之 cytokinin 及濃度亦不相同。自珠心胚分化之珠心苗，理論上爲健康苗，恢復植物的生長勢，並具植物幼年期的特徵但有相當程度變異，本試驗的目的爲利用珠心苗之天然變異，選育變異品系。

關鍵字：單胚及多胚柑橘、珠心胚、莖頂嫁接、植株變異

Key words: monoembryonic and polyembryonic citrus, nucellar embryogenesis, shoot-tip grafting, somatic variants.

概 論

柑橘種子的多胚性自1719年即有記載[7] 種子內之無性胚可由花苞及幼果中未受粉的子房或胚珠[4,8] 或已受精的胚珠或珠心組織誘導產生[6,11,12,13]，Starrantino & Russo[16] 及Moore[8] 以成熟果實內未發育之胚珠爲材料，誘導不定胚。Maheshwari & Ranga Swamy[6]，Rangan, Murashige, & Bitters[12,13]，Mitra & Chaturvedi[7] 從事培養試驗及細胞觀察說明柑橘不定胚的分化，實由珠心組織內的特殊細胞分裂而來，因此不論以何種材料從事培養，珠心組織實爲不定胚的眞正來源，因此柑橘之不定胚一般係指珠心胚，珠心胚發育之苗，同如實生苗可恢復植物之生長勢，挽救植物長久行無性繁殖，導致活力之逐漸衰退，珠心苗爲健康苗[6]，但具變異[11]，及幼年期的性徵，故以頂梢嫁接法[11,15] 培養健康苗時，則縮短植物的幼年期，可提前開花結實，但自高齡之優良母樹，取其頂芽，從事頂梢嫁接時不易立即獲得結果，以珠心苗爲健康苗，並由其變異從事選種及育種，珠心苗之培養仍具價值。

多胚柑橘珠心胚的誘導、繁殖及植株分化

粗皮檸檬 (*Citrus jambhiri* Lushinton, Rough Lemon)，黎檬 (*C. limonia* Osbeck, Rangpur Lime)，酸橙 (*C. aurantium* Linn, Sour Orange)，酸橘 (*C. sunki* Hort. ex Tan.)，美女橘 (*C. reshni* Hort. ex Tan. Cleopatra)，枳殼 (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) 及椪柑 (*C. reticulata* Blanco, Ponkan Mandarin)

1)此研究工作得農委會專案補助。This work was funded by Council of Agriculture.

2)中央研究院、植物研究所。Inst. of Botany, Academia Sinica.

3)臺灣省農業試驗所園藝系。Dept. Hort. TARI.

4)臺灣省農業試驗所嘉義分所園藝系。Dept. Hort., CAES, TARI.

柳橙（*C. sinensis* Osbeck）爲試驗樹種，開花後4－8週之幼果爲試驗材料，先將果實清洗及表面殺菌（5倍稀釋之家用漂白水，含 1% NaClO，泡30分鐘），於無菌箱中取出胚珠，再置於解剖顯微鏡下切除有性胚（此時之有性胚爲球體期及心臟期）、內外珠被，及 Chalazal end 之珠心組織後，將珠孔端之珠心組織置於培養基上，培養基爲 Murashige & Skoog 鹽類[9]，1mg/l Thiamine HCl, 0.5mg/l Pyridoxine HCl, 0.5mg/l Nicotinic acid, 2mg/l L-Glycine, 100mg/l i-Inositol, 10mg/l Adenine Sulfate, 500mg/l Malt Extract, 50,000mg/l Sucrose, 0.8% TC Agar 或 0.2% Gelrite pH5.7 ，培養2週後珠心組織逐漸分化珠心胚，珠心胚先期分化迅速，但於8週後逐漸減慢，終至停止分化及生長，此衰退的趨勢，於培養基中加入 BA 或 2ip 而消失，以 60mg 之培殖體置於不同濃度之 BA 或 2ip（0, 0.3, 1, 3, 10mg/l）中，試驗結果顯示酸橙之最適濃度 0.3mg/l BA 可使珠心胚增殖20倍，自原來之 60mg 增殖至1260±0.4 mg，美女橘於 1mg/l BA 增殖4倍產生 243±0.0mg 之不定胚，粗皮檸檬於 0.3mg/l BA 增殖43倍產生 2619±0.3mg，酸橘於 10mg/l 2ip 中增加9倍，產生 526±0.1mg，椪柑及柳橙在 0.3mg/l BA 中各增加27及29倍，產生 1611±0.2 及 1764±0.3mg，黎檬則無須加入任何 Cytokinin ，可維持22倍之增殖率，如彩9、1 及表一。

表一、不同橘種所須 cytokinin 之濃度以維持珠心胚之不斷分化和生長

Table 1. Cytokinin requirements for maintenance of nucellar embryogeny in vitro of *Ctirus* species.

Rootstock Species	Cytokinin Supplement, mg/L
Citrus aurantium	0.3 BA
C. jambhiri	0.3 BA
C. limonia	None
C. reshni	1 BA
C. sunki	10 2iP
Scion Species	
Citrus grandis	
cv. Ma Dou Bai You	0.3 2ip
cv. Ma Dou Wen Dan	0.3 BA
C. reticulata	0.3 BA
C. sinensis	0.3 BA

BA＝N^6—benzyladenine, 2iP＝N^6—isopentenyladenine

移殖於新鮮培養基時，若不將舊胚切割，而由其逐漸老化，則珠心胚逐漸成熟、分化植莖，將培養基中之 Cytokinin 去之，並加入 0.5mg/l 之 NAA ，則促進發根，形成植株（圖1. 2.）。

珠心胚之培養環境 25°C 恆溫，16小時光照及 30μE m^{-2} sec^{-1} 光强，發根時之光强爲 42μE m^{-2} sec^{-1}。

單胚柑橘不定胚之誘導、繁殖及植株分化

麻豆白柚及麻豆文旦的幼果如多胚柑橘的處理方法切取珠孔端之珠心組織，培養於不同濃度之 2ip（0, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3mg/l）及 NAA（0, 0.01, 0.1, 1mg/l）之上述

培養基中，發現 0.3mg/l 2ip 及 0—0.1mg/l NAA 可誘導30%麻豆白柚形成珠心胚，將此濃度應用於麻豆文旦時，僅獲得0.4%的成功。

麻豆白柚珠心胚誘導後，繁殖迅速，於四個月後自行分化根、莖或植株，將植株移植於花盆中，易於成活（95%以上），並繼續生長茁壯於臺灣省農試所隔離網室內。

麻豆文旦珠心胚誘導後繁殖迅速，唯植株分化甚難，曾以各種條件試之，如低温（6°C 處理 0，1，2，4 週，及 17°C 處理 4 週），高温（37°C 處理 0，3，5，10，20日），GA_3（0, 0.1, 1, 10mg/l），BA（0, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100mg/l)醣類如蔗醣、葡萄醣、半乳醣（0，1，2，3，5，7.5，10%），甘油（glycerol）（0, 100, 200, 300, 400, 800mM），TC Agar 與 Gelrite 之比較，及培養基更新時間(Starvation)（4，8，12，24週）等，皆無植莖分化的效果，僅偶爾見根分化，若將幼胚不予切割繁殖，其體積逐漸增加，並逐漸老化成扁平狀，自基部處分化 1—5 莖，將植莖切下，誘導發根，未能成功並逐漸落頂落葉而枯萎，若於落葉前將頂芽切下嫁接於 Troyer Citrange 之無菌播種之種子苗上，嫁接芽則迅速抽長生長，將整株嫁接苗移植於花盆中，或僅切下試管中的頂芽，再次嫁接於網室內之柚類砧木上，成活率高(95%以上)，可繼續生長茁壯（圖 3），於臺灣省農試所、嘉義分所、及臺南農改場的網室內。

麻豆白柚之試管株心苗於臺灣省農試所網室內生長至今已三年餘（圖 4），葉節耀先生並將長至屋頂（約 3 公尺）之頂芽取下嫁接於同珠之基部砧木上，使其再次生長以促進開花，至今尚未見開花結實，依葉形、葉針等外表形態觀察分析未見變異，麻豆文旦則顯出植株間葉形及厚度相異的情形，麻豆文旦於農試所及臺南農改場生長已近兩年，仍繼續進行生長觀察及變異調查。

討　論

本試驗之多胚及單胚橘種來自臺灣省農業試驗所嘉義分所園藝系之果園，麻豆白柚及麻豆文旦得以順利誘導珠心胚及珠心苗實銘感於該單位之熱心協助，慷慨供給各種試驗材料。多胚柑橘試驗甚易，此與天然產生無性胚的能力有關，無性胚分化源自珠心組織，誘導後逐漸衰退，不能繼續分化新胚，而產生癒合組織（Callus）[5.6.17]，此可能與細胞內之 Auxin/Cytokinin 比率有關，珠心組織分化珠心胚後，珠心胚繼續分生的能力逐漸降低，培養基中若加入適量的 Cytokinin 則恢復其繼續分化繁殖的能力，及產生新胚至今已六年未見衰退，推測培養基中加添之 Cytokinin 可維持此二種植物生長素之生理平衡，故而促使胚體不斷增殖，有趣的是橘種不同時，所須 Cytokinin 之種類及濃度各異，經一系列的試驗遂而建立各橘種之最適濃度及各橘種穩定之試管生長。

單胚柑橘不易以人工方法誘導無性胚，推測此與其天性不能分化無性胚有關，Esan[2] 對此問題加以探討，認爲單胚柑橘種子內不產生無性胚，可能與種子內分泌之抑制物質有關，他發現此物質分泌自 Chalazal end，將 Citron (*C*. medica) 去珠孔端之胚珠與椪柑胚珠共同培養（Co-culture），椪柑珠心胚的分化則顯著減少，且減少程度與 Citron 胚珠數成正比，將椪柑珠孔端嫁接於 Citron chalazal end，則導致椪柑珠心胚的產生能力減低 2 倍以上，Esan 又比較美女橘（Cleopatra Mandarin）的胚珠其切除 Chalazal end 與否，或僅培養珠孔端之珠心組織，或僅培養 Chalazal end 之珠心

織四種試驗，發現僅培養珠孔端之產生最多珠心胚，其次爲去除 Chalazal end 之胚珠組織，僅培養 Chalazal end 時珠心胚分化最少，此試驗可推測胚珠內 Chalazal end 會分泌某種物質，可抑制無性胚的分化，此物質爲何，至今尚不清楚。

珠心組織分化之珠心胚及珠心苗，理論上爲健康苗，不含任何病毒或其他病原體，本試驗之10種柑橘比較僅麻豆文旦外型顯出變異，其他樹種則頗爲穩定，其他如開花、結實等內在變異尚待繼續評估。Navarro, Ortiz and Juarez[11] 比較 Clementin 8品系之珠心苗發現有29%之變異，珠心苗變異時可否產生重要農業性狀之改變如抗病、耐旱、耐鹽、耐殺草劑或改善果實品質及改變花期等並無不能，唯其屬於育種選種的範圍須較長時間從事之。

參考文獻

1. BUTTON, J. & C. E. J. BOTHA. 1975. Enzymatic maceration of citrus callus and the regeneration of plants from single cells. J. Exp. Bot. 26 : 723—729.
2. ESAN, E. B. 1973. A detailed study of adventive embryogenesis in the Rutaceae. Ph. D. Dissertation, University of California, Riverside.
3. KOBAYASHI, S., I. IKEDA, & M. NAKATANI. 1979. Studies of nucellar embryogenesis in citrus. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 48 : 179—185.
4. KOCHBA, J. & P. SPIEGEL-ROY. 1977. Cell and tissue culture for breeding and developmental studies of citrus. HortSci. 12 : 110—114.
5. KOCHBA, J., G. BEN-HAYYIM, P. SPIEGEL-ROY, S. SAAD, & H. NEUMANN. 1982. Selection of stable salt-tolerant callus cell lines and embryos in *Citrus sinensis* and *C. aurantium*. Z. Pflanzenphysiol. 106 : 111—118.
6. MAHESHWARI, P. & N. S. RANGA SWAMY. 1958. Polyembryony and in vitro culture of embryos of *Citrus* and *Mangifera*. Indian J. Hort. 15 : 275—282.
7. MITRA, G. C. & H. C. CHATURVEDI. 1972. Embryoids and complete plants from unpollinated ovaries and from ovules of in vivo grown emasculated flower buds of *Citrus* spp. Bull. Torrey Bot. Club 99 : 184—189.
8. MOORE, G. A. 1985. Factors affecting in vitro embryogenesis from undeveloped ovules of mature *Citrus* fruit. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 110 : 66—70.
9. MURASHIGE, T. & F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15 : 473—497.
10. NAUER, E. M., C. N. ROISTACHER, T. L. CARSON, & T. MURASHIGE. 1983. In vitro shoot-tip grafting to eliminate citrus viruses and virus-like pathogens produces uniform budlines. HortSci. 18 : 308—309.

11. NAVARRO, L., J, M. ORTIZ, & J. JUAREZ. 1985. Aberrant citrus plants obtained by somatic embryogenesis of nucelli cultured in vitro. HortSci. 20 : 214—215.
12. RANGAN, T. S., T. MURASHIGE, & W. P. BITTERS. 1968. In vitro initiation of nucellar embryos in monoembryonic citrus. HortSci. 3 : 226—227.
13. RANGAN, T. S., T. MURASHIGE, & W. P. BITTERS. 1969. In vitro studies of zygotic and nucellar embryogenesis in citrus. Proc. First Intl. Citrus Symp. 1 : 225—229.
14. ROISTACHER, C. N., L. NAVARRO, & T. MURASHIGE. 1976. Recovery of citrus selections free of several viruses, exocortis viroid, and *Spiroplasma citri* by shoot-tip grafting in vitro. In F. C. Calavan ed. 7th Conf. Intl. Organization Citrus Virol. IQCV, Riverside pp. 186—193.
15. SPIEGEL-ROY, P. & J KOCHBA. 1973. Stimulation of differentiation in orange (*Citrus sinensis*) ovular callus in relation to irradiation of the media. Radiation Bot. 13 : 97—103.
16. STARRANTINO, A. & F. RUSSO. 1980. Seedlings from undeveloped ovules of ripe fruits of polyembryonic citrus cultivars. HortSci. 15 : 296—297.

Summary

Nucellar embryogenesis of citrus enabled to induce with different cytokinins at various concentrations depending on species. Plant regenerations were obtained after prolonged consecutive cultures in the same medium. Tested species included monoembryonic: *Citrus grandis* cvs. Ma-Dou-Wen-Dan and Ma-Dou-Bai-You, polyembryonic: *C. aurantium*, *C. jambhiri*, *C. limonia*, *C. reshni*, *C. reticulata*, *C. sinensis*, *C. sunki*, and *Poncirus trifoliata*. Theoretically plants differentiated from nucellar embryos were free of pathogens and regained tree vigor showing juvenile traits. Somatic variations appeared in vitro on morphology were selected for variants on crop breeding program.

問 題 討 論

范念慈：

請教一個問題。剛才你實驗研究裡面談到怎麼樣把單胚性的柚子引誘成珠心胚，我的問題是問怎麼樣鑑別單性胚的柚子裡面的有性胚與珠心胚的方法。

黃麗春：

這個問題是我在報告過程中漏掉的，這是在我們取材時候的階段上最重要的一段。我們要在四週到八週的幼果時期，把它的胚珠取出來，在顯微鏡底下一定要看它有性胚的發育出現，有性胚這個時候發育，是在球體期以及前期的心臟期，這個時候有性胚看得很清楚，我們在這個時候把有性胚挑掉，剩下的珠心組織拿來培養。這個時候無性胚還沒有發育。

范念慈：

利用時期的早晚，是吧？

黃麗春：

對。所以我們必須很早時期做這個。

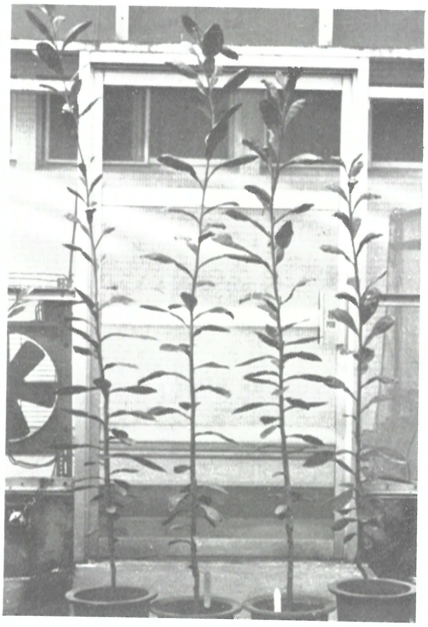
林 樸：

關於單胚柑橘得到珠心胚，在幾年前是很新奇的東西， 就是 Murashige 他們做的 orange 也是單胚的，它變成珠心胚柑橘是一個很大的突破 ，也是一個很大的新聞。今天現在臺灣也有單胚的白柚跟文旦變成珠心胚的東西，這表示我們臺灣在這方面也有很大的進步，也是在世界上居於領導的地位，所以今天非常恭喜黃小姐。

黃麗春：

謝謝林教授鼓勵。

1. 2.



3.

4.

圖 1 、粗皮檸檬珠心胚分化之珠心苗。
Fig. 1. Plants differentiated from nucellar embryos of rough lemon. (1X)

圖 2 、枳殼珠心苗之分化。
Fig. 2. Plants originated from nucellar embryos of *P. trifoliata*. (1X)

圖 3 、麻豆文旦試管嫁接珠心苗之頂芽再次嫁接於網室柚類砧木上之二年生長。
Fig. 3. Two-year-old plants of *C. grandis* cv. Ma-Dou-Wen-Dan in screen house with shoot tips from in vitro regrafted onto green house growing shaddock rootstocks. Plants being first grafted onto troyer citrange in vitro.

圖 4 、麻豆白柚珠心苗自試管移植於網室後三年之生長。
Fig. 4. Three years old plants from nucellar embryos of *C. grandis* cv. Ma-Dou-Bai-You in screen house.